

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-054162

(43)Date of publication of application : 09.03.1987

(51)Int.Cl.

G01N 30/48
B01D 15/08
C08F 8/18
// C07K 3/20

(21)Application number : 61-075762

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 02.04.1986

(72)Inventor : ITAGAKI KOJI
KUSANO HIROSHI
MIYATA EIJI
KUBOTA HIROHISA

(30)Priority

Priority number : 60 74705 Priority date : 09.04.1985 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF SEPARATING AGENT AND SEPARATING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To increase mechanical strength and to decrease non-specific absorption to materials associated to living bodies by subjecting monomers of specific components having a functional group to a suspension polymn. to obtain porous crosslinked polymer particles.

CONSTITUTION: The crosslinking component consisting of alkylene di(meth) acrylate and/or glycerine poly(meth) acrylate is obtd. A main chain component consisting of ester and/or ether having a polymerizable vinyl group of isopropenyl group and functional group is obtd. These crosslinking components and main chain component are suspension-polymerized to obtain the crosslinked polymer. The functional group of the polymer is chemically modified by a compd. contg. a fluorine compd. or compd. contg. fluorine atoms and hydrophilic group. The separating agent which has the high mechanical strength and the small non-specific adsorption to the materials associated to living things is thus produced.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-54162

⑪ Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和62年(1987)3月9日
G 01 N 30/48		D-7621-2G	
B 01 D 15/08		6685-4D	
C 08 F 8/18	MGR	7167-4J	
// C 07 K 3/20		8318-4H	審査請求 未請求 発明の数 2 (全17頁)

⑭ 発明の名称 分離剤の製造方法および分離剤

⑮ 特 願 昭61-75762

⑯ 出 願 昭61(1986)4月2日

優先権主張 ⑰ 昭60(1985)4月9日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭60-74705

⑳ 発 明 者	板 垣 孝 治	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
㉑ 発 明 者	草 野 裕 志	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
㉒ 発 明 者	宮 田 栄 二	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
㉓ 発 明 者	久 保 田 裕 久	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内
㉔ 出 願 人	三菱化成工業株式会社	東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
㉕ 代 理 人	弁理士 長谷川 一	外1名

明 細 書

1 発明の名称

分離剤の製造方法および分離剤

2 特許請求の範囲

- (1) アルケレンジ(メタ)アクリレート及び／又はグリセリンポリ(メタ)アクリレートから成る架橋成分と、重合性のビニル基またはイソプロペニル基と官能基を有するエステル及び／又はエーテルから成る主鎖成分とを懸濁重合させて架橋共重合体を得、次いで、該共重合体粒子の官能基をフッ素原子を含む化合物又はフッ素原子を含む化合物と親水性基を含む化合物で化学修飾してフッ素原子及び親水性基を有する分離剤の製造方法。
- (2) フッ素原子がフルオロアルキル含有基として含まれることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の製造方法。
- (3) 得られた架橋共重合体が多孔質架橋共重合体粒子である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の製造方法。

- (4) 得られた架橋共重合体乾燥基準で0.5～3 ml/gの多孔度と1～2000 μmの平均粒径を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第3項いずれかに記載の製造方法。
- (5) 主鎖成分に含まれる官能基がエポキシ基またはヒドロキシ基である特許請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の製造方法。
- (6) 化学修飾に使用されるフッ素原子を含む化合物が、フルオロアルコール、フルオログリコール、フルオロアルキルカルボン酸、フルオロアルキルカルボン酸誘導体の群から選ばれた1種又は2種以上のフルオロアルキル基含有化合物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の製造方法。
- (7) 化学修飾剤として使用される親水性基を含む化合物が水、多価アルコール、エポキシ基を有するアルコール、炭素の群から選ばれた1種又は2種以上であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の製造方法。

(8) 架橋共重合体の官能基の一部をフッ素原子を含む化合物で化学修飾し、次いで残余の官能基を親水性基を導入しうる化合物で化学修飾することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第7項のいずれかに記載の製造方法。

(9) フルオロアルキル基が直鎖状であり、多孔質架橋共重合体粒子中のフッ素原子の含有率が1～30重量%であつて、分離剤がゲル透過クロマトグラフィー用担体であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第7項いずれかに記載の製造方法。

(10) アルキレンジ(メタ)アクリレート及び／又はグリセリンポリ(メタ)アクリレートからなる架橋成分と下記一般式(1)及び／又は(2)で表わされるフッ素化合物含有エステル成分と下記一般式(3)及び／又は(4)で表わされるグリセリン誘導体エステル成分及び／又はポリエチレングリコールエステル成分を実質的な構成成分とし、且つ乾燥基準の多孔度が0.5～3 ml/g、平均粒径が1～2000 μmの多

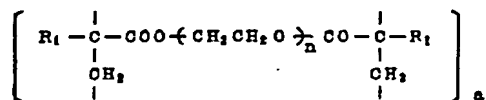
(上記一般式(3)及び(4)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 R_2 は $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{H}$ (但し、 $n =$

0～10の整数)、 $-\text{CH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{OH}$ 、

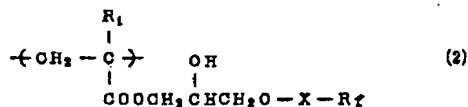
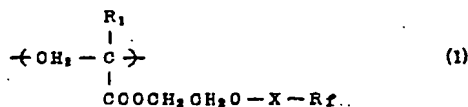
$-\text{CH}_2\text{C(CH}_2\text{OH)}_2$ 、 $-\text{Glu}$ (Gluはグルコースの残基)、 $-\text{CD}$ (CDはシクロデキストリンの残基)又は $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}$ (但し、 $m =$

0～10の整数)を表わす。 n は1～4の整数を表わす)

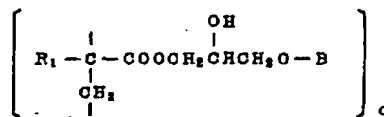
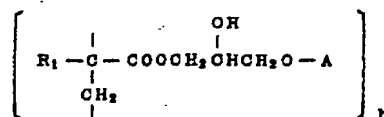
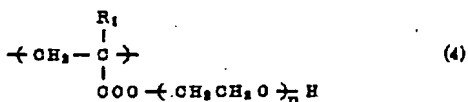
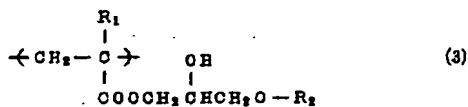
(11) 下記一般式(a)(b)(c)の構成単位で実質的に構成されてなる多孔質架橋共重合体粒子であり、該粒子中のフッ素原子含有量が1～30重量%であつて、分離剤がゲル透過クロマトグラフィー担体用分離剤であることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載の分離剤。



孔質架橋共重合体粒子よりなることを特徴とする分離剤。



(上記一般式(1)及び(2)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 X はメチレン基又はカルボニル基、 R_f は炭素数10以下の直鎖状のフルオロアルキル基を表わす)

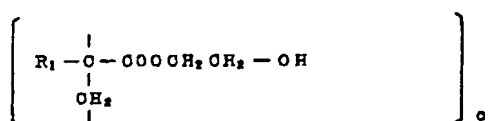
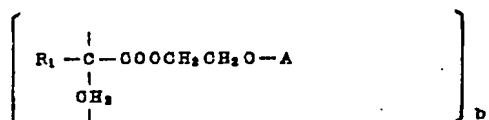
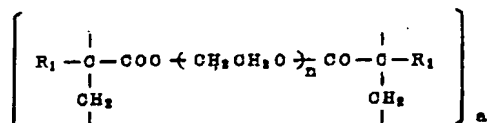


(上記一般式(a)(b)(c)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 n は1～3の整数、 A は $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{COCF}_3$ 又は $-\text{COCF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 B は $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C(CH}_2\text{OH)}_2$ 、 $-\text{Glu}$ (Gluはグルコース残基)、 $-\text{CD}$ (CDはシクロデキストリン残基)を表わす。

a ; b ; $c = 0.01 \sim 0.55$; $0.01 \sim 0.70$; $0.10 \sim 0.95$ (モル分率)

(12) 下記一般式(a)(b)(c)の構成単位で実質的に構成されてなる多孔質共重合体粒子であり、該粒子中のフッ素含有量が1～30重量%であ

つて、分離剤がゲル透過クロマトグラフィー担体用分離剤であることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載の分離剤。



(上記一般式(a)(b)(c)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 n は1~3の整数、 A は $-OOCF_2CF_2CF_2$ 、 $-COCF_2$ を表わす。

a ; b ; $c = 0.01 \sim 0.55$; $0.01 \sim 0.70$

(上記一般式(a)(b)(c)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 A は $-CH_2CF_2$ 、 $-CH_2CF_2CF_2CF_2$ 又は $-COCF_2CF_2CF_2$ 、 B は $-H$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_2OH$ を表わす。

a ; b ; $c = 0.01 \sim 0.55$; $0.01 \sim 0.70$; $0.10 \sim 0.95$ (モル分率))

3 発明の詳細な説明

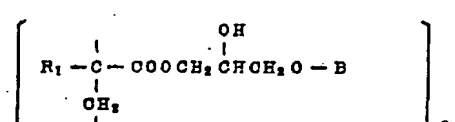
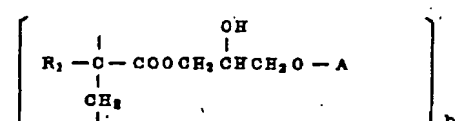
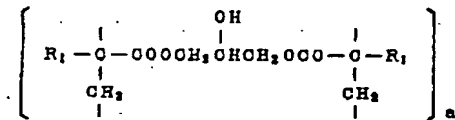
(産業上の利用分野)

本発明は、各種成分を含む混合溶液から目的成分を分離、精製する際に使用される分離剤の製造方法に関するものであり、詳しくは、蛋白質、酵素、糖質、抗生物質等の生体関連の比較的高分子量の物質を分離、精製するのに好適な分離剤の製造方法に関するものである。

なお、本発明において「分離剤」なる語は、例えばイオン交換クロマトグラフィーやゲル透過クロマトグラフィー等の分離操作で使用され、通常、吸着剤、クロマト担体と称されているものを含む広義の概念を意味する。

; $0.10 \sim 0.95$ (モル分率))

03 下記一般式(a)(b)(c)の構成単位で実質的に構成されてなる多孔質架橋共重合体粒子であり、該粒子中のフッ素原子含有量が1~30重量%であつて、分離剤がゲル透過クロマトグラフィー担体用分離剤であることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載の分離剤。



(従来の技術)

従来、生体関連物質の分離、精製には、有機系の分離剤としては、デキストラン又はアガロースゲルを基材とする分離剤がとりわけアフィニティークロマト手法を中心とする分離操作の分野で注目されている。

しかしながら、上記のアガロースゲルのような多糖類系分離剤では、機械的強度が十分でないと共に生体関連物質と種々の相互作用に基づく、親和性を持つという問題がある。蛋白質と分離剤自体の相互作用には、疎水性相互作用、水素結合、静電的相互作用等があるといわれているが、このような相互作用が大きいと、例えば本来分子サイズの違いによつて物質間の分離を意図するゲル透過クロマトグラフィーに於ても、分子サイズ以外の相互作用によつて分離性が変化する現象が生じ、期待する分離性が得られないなどの問題が生じる。

非特異的吸着現象では、生体関連物質を相互に分離する際の選択性の問題であり、従つて、

斯る現象の結果、前記従来の分離剤では、十分な分離機能や分離剤の長期なライフを期待し得ない。

〔発明の目的〕

本発明の目的は、機械的強度が大きく、かつ生体関連物質に対する非特異的吸着現象の小さい、新規な分離剤の製造方法を提供する点にある。

しかして、斯る本発明の目的は、アルキレンジ(メタ)アクリレート及び/又はグリセリンポリ(メタ)アクリレートからなる架橋成分と重合性のビニル基またはイソプロペニル基と官能基を有するエステル及び/又はエーテルから成る主鎖成分とを懸濁重合させて、架橋重合体を得、次いで、該共重合体の官能基をフッ素化合物を含む化合物又はフッ素原子を含む化合物及び親水性基を含む化合物で化学修飾することとを特徴とするフッ素原子及び親水性基を有する分離剤の製造方法および該方法で得られる新規な分離剤によつて達成される。

リレート、ポリエチレングリコールジメタクリレート、ポリプロピレングリコールジメタクリレート等が挙げられる。代表的にはエチレングリコールジ(メタ)アクリレートが使用される。グリセリンポリ(メタ)アクリレートとしては、グリセリントリアクリレート、グリセリンジメタクリレート等が挙げられる。

重合性のビニル基またはイソプロペニル基を有し、かつ官能基を有するエステル又はエーテルとしては、後述する化学修飾剤との反応によつて該官能基に対し、フルオロアルキル含有基と親水性基を導入し得る化合物であれば特に制限はない。通常は、官能基としてエポキシ基、ヒドロキシ基を有する化合物が用いられる。例えば重合性のビニル基またはイソプロペニル基を1個有するカルボン酸(好ましくは炭素数3~12)のグリシジルエステル、該カルボン酸のヒドロキシアルキルエステルおよび重合性のビニル基またはイソプロペニル基を1個有するアルケニル(好ましくは炭素数3~12)グ

〔発明の構成〕

本発明の製造方法は、官能基を有する特定成分の単量体を懸濁重合させて多孔質架橋共重合体粒子を得、該共重合体の官能基を化学修飾してフルオロアルキル含有基と親水性基を導入することによりなる。

本発明方法においては、単量体として、アルキレンジ(メタ)アクリレート及び/又はグリセリンポリ(メタ)アクリレートからなる架橋成分と重合性のビニル基またはイソプロペニル基と官能基を有するエステル及び/又はエーテルからなる主鎖成分とを使用する。

アルキレンジ(メタ)アクリレートとしては、炭素数2~3のアルキレングリコール又は重合度が4以下極度のポリアルキレングリコールとアクリル酸もしくはメタクリル酸とのエステルが好ましく用いられる。具体的には、エチレングリコールジアクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、プロピレングリコールジアクリレート、プロピレングリコールジメタク

リシジルエーテルから選ばれる化合物が用いられる。

具体例としては、グリシジル(メタ)アクリレート、アリルグリシジルエーテル又は2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコールモノ(メタ)アクリレートが使用される。

本発明方法においては、先ず、前述の架橋成分と主鎖成分とを懸濁重合させて多孔質架橋共重合体粒子を製造する。架橋成分の使用割合は、通常、全成分に対し1~50重量%、好ましくは5~30重量%の範囲から選ばれる。

懸濁重合は公知の方法に従つて、有機希釈剤、重合開始剤等の存在下に水中油型の重合が行われる。多孔質化剤として用いられる有機希釈剤としては、グリシジル基、ヒドロキシ基等の前述の官能基に対して不活性であれば特に制限はない。通常はベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、クロルベンゼン、ローオクタン、ジクロルエタン、~~トリクロルエタン~~シクロヘキソ-

ル、 α -オクタールアルコール、 α -ドデシルアルコール、ジブチルエーテル、ジブチルエーテル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、シクロヘキサノン、メチルイソブチルケトン等の単独又は混合溶剤が用いられる。通常その使用量は、全単量成分に対し0.05〜3重量倍とされる。また、重合開始剤としては、過酸化ジベンゾイル、過酸化ジウラロイル、アゾビスイソブチロニトリル等が用いられ、通常その使用量は0.01〜1.0重量%濃度の範囲から選ばれる。

懸濁重合終了後、重合体は過分離、洗浄され、側鎖に官能基を有する多孔質架橋共重合体粒子として回収される。

多孔質架橋共重合体粒子の多孔度、平均粒径は広範囲から任意に選択し得るが、通常は、乾燥基準で、0.1〜3 ml/g、好ましくは0.3〜2.0 ml/gの多孔度と1〜2000 μ m、好ましくは10〜200 μ mの平均粒径の範囲とされる。

次いで、本発明方法では、得られた多孔質共重合体粒子の官能基を化学修飾してフルオロア

ルキル含有基と親水性基を導入することを最大の特長とする。

本発明において化学修飾とは、共重合体の官能基と後述する化学修飾剤とが反応し、その結果として共重合体にフッ素原子の導入および/または親水性基の導入が行われれば足り、従つて、化学修飾剤それ自体が必ずしも十分な親水性の基を有していることを必要としない。例えば、後述するように、共重合体の主鎖成分として水酸基を含有する β -ヒドロキシエーテル(メタ)アクリレートを使用した場合には、該共重合体それ自身が、既に親水性の水酸基を有しているので、その一部をフッ素原子で置換すればよい。従つてこの場合には、フッ素原子を含む化合物を化学修飾剤として使用する。

本発明における化学修飾は、ポリマーである多孔質架橋共重合体粒子に対して行われるものであるが、修飾反応自体は、低分子有機化合物に対する反応と同等異なるところはない。

従つて、化学修飾の方法は、官能基の種類に

より適宜採用される公知の反応を利用して行うことができ、特に制限されるものではない。

代表的な官能基に対する化学修飾方法を例示すれば次の通りである。

(a) 官能基が水酸基の場合

- (i) フルオロアルキル基を有するカルボン酸、酸ハロゲン化物又は酸無水物と多孔質架橋共重合体粒子中の一部の水酸基とを反応させる。相当するエステル化合物の生成によりフルオロアルキル基が導入される。典型的な例は、トリフルオロ酢酸を必要に応じて硫酸、リン酸等の触媒の存在下に反応させる方法である。
- (ii) ハロゲン、トシル基(-OTs)等の脱離基を有するフルオロアルキル化合物と多孔質架橋共重合体粒子中の一部の水酸基とを反応させる。相当するエーテル化合物の生成によりフルオロアルキル基が導入される。
- (iii) 臭化シアン(CNBr)を用いた公知の方法によりシアナートを得、これに、フルオロアルキル基を有するカルボン酸、アルコール等を

反応させる方法。

(b) 官能基がエポキシ基の場合

- (i) フルオロアルコール又はフルオログリコールと多孔質共重合体粒子中のエポキシ基を酸又はアルカリ触媒の存在下に反応させる。相当するエーテル化合物の生成によりフルオロアルキル基が導入されると共に付加開環反応により水酸基が生成する。代表的なフッ素原子含有化合物は、2,2,2-トリフルオロエタノール、2,2,3,3,4,4,4-ヘプタフルオロノ-ブタノール、テトラフルオロエチレングリコール等である。
- (ii) フルオロアルキル基を有するカルボン酸、酸ハロゲン化物又は酸無水物とエポキシ基とを反応させる。相当するエステル化合物の生成によりフルオロアルキル基が導入されると共に水酸基が生成する。代表的なフッ素原子含有化合物は、トリフルオロ酢酸である。
- (iii) α -ハロエステル、活性メチレンに由来する金属エノレート、Grignard 試薬等とエポ

キシ基とを反応させ、前記と同様にフルオロアルキル基を導入し、水酸基を生成させる。

(V) フッ化水素を反応させてフッ素原子と親水性基を同時に形成させる。

また、官能基がエポキシ基の場合、前記化学修飾はエポキシの全量について行うことも可能であるが、化学修飾反応を部分的に行い、次いで、フッ素原子を含まずに親水性基のみを含む化合物で残部のエポキシ基に親水性基を導入するのが好ましい。

このような二段階化学修飾処理の方法によれば、フルオロアルキル基と親水性基の導入割合を容易に調節でき、疎水性および親水性の両特性がその表面に好適な比率で付与された多孔質架橋共重合体粒子が容易に得られる。

二段階化学修飾処理において親水性基を導入する後段反応で使用する化学修飾剤としては、水、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、ペンタエリスリトール、ポリビニルアルコール等

0~120℃程度の温度とするのが好ましい。反応時間は、いずれの反応も触媒の種類等により異なるが、一般には10時間以内で十分である。

本発明の化学修飾において、架橋共重合体に導入されるフッ素原子の割合は、吸着剤やクロマト担体等の分離剤の用い方(分離モード)あるいは、分離すべき対象成分の種類等によつて最適範囲が適宜選択されるが、一般には架橋共重合体中のフッ素原子の含有率として1~30重量%、好ましくは2~15重量%とされる。また、親水性基の割合は、特に制限はないが通常、架橋共重合体の側鎖の官能基に親水性基を導入する場合には、官能基の10~90モル%、好ましくは30~80重量%である。

また主鎖成分として親水性の官能基を有する化合物、例えばヒドロキシアルキルエステルを使用した場合は、官能基(ヒドロキシ基)の30~90重量%でよい。

また前述の二段階化学修飾処理においては、

の多価アルコール、グリシドール等のエポキシ基を有するアルコール、グルコース、マルトース、シクロデキストリン等の御類等が好ましく使用される。また、触媒としては、硫酸、リン酸、塩酸、過塩素酸、水酸化ナトリウム^等、金属ナトリウムが好適に使用される。

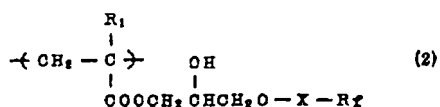
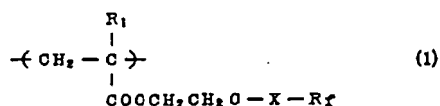
化学修飾反応において、溶媒の使用は必須の条件ではないが、反応の均一性、操作性の観点からは溶媒を共存させるのが好ましい。溶媒としては、フッ素含有化合物を溶解し、官能基を有する架橋共重合体および触媒に不活性な物質でなければならず、また、ルイス酸や金属ナトリウムを触媒として使用する場合には十分に乾燥したものを使用する必要がある。溶媒としてはエーテル類、炭化水素類が好ましく用いられ、具体的には、ジオキサン、トリオキサン、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

また、反応温度は、架橋共重合体の耐熱温度を考慮し、通常は170℃以下、好ましくは、

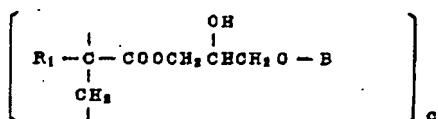
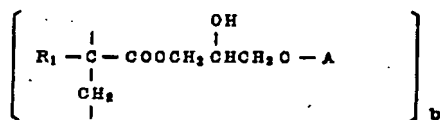
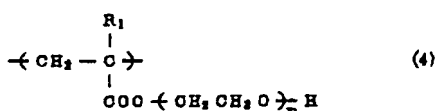
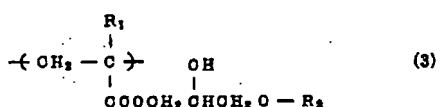
前段反応で共重合体官能基の10~70重量%、好ましくは20~50重量%を化学修飾させてフッ素原子を導入し、次いで残部の官能基を後段反応で親水性基に置換するのが好ましい。

前述の製造方法で得られる本発明の分離剤は、それ自体新規な構造を有し、次のような化学構造を有する。

すなわち、アルキレンジ(メタ)アクリレート及び/又はグリセリンポリ(メタ)アクリレートからなる架橋成分と下記一般式(1)及び/又は(2)で表わされるフルオロアルキル含有エステル成分と下記一般式(3)及び/又は(4)で表わされるグリセリン誘導体エステル成分及び/又はポリエチレングリコールエステル成分を実質的な構成成分とし、且つ、乾燥基準の多孔度が0.1~3ml/g、好ましくは0.3~2.0ml/g、平均粒径が1~2000μm、好ましくは10~200μmである。



〔上記一般式(1)及び(2)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 X はメチレン基又はカルボニル基、 R_2 は炭素数10以下の直鎖状のフルオロアルキル基を表わす〕



〔上記一般式(a)(b)(c)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 n は1~3の整数、 A は $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{OOCF}_3$ 又は $-\text{COCF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 B は $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ 、 $-\text{Glu}$ (Glu はグルコースの残基)、 $-\text{CD}$ (CD はシクロデキストリンの残基)を表わす。

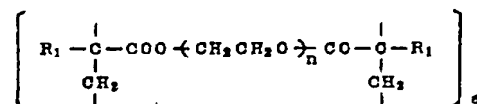
$a; b; c = 0.01 \sim 0.55; \frac{0.01}{0.01} \sim 0.70; 0.10 \sim 0.95$ (モル分率)

〔I〕下記一般式(a)(b)(c)の構成単位で実質的に構成されてなる多孔質架橋共重合体粒子であつ

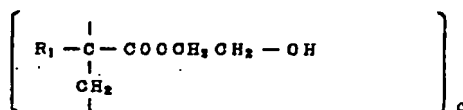
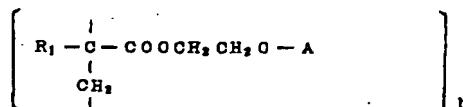
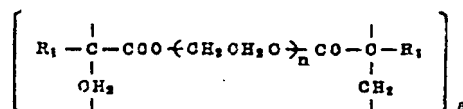
〔上記一般式(3)及び(4)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 R_2 は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{H}$ (但し、 $2=0 \sim 10$ の整数)、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ 、 $-\text{Glu}$ (Glu はグルコースの残基)、 $-\text{CD}$ (CD はシクロデキストリンの残基)又は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2-\text{OH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ (但し、 $m=0 \sim 10$ の整数)を表わす。 n は1~4の整数を表わす〕

また、前記一般式で表わされる多孔質架橋共重合体粒子の中で特に好ましい共重合体は、次の〔I〕、〔II〕、〔III〕の三種の共重合体である。

〔I〕下記一般式(a)(b)(c)の構成単位で実質的に構成されてなる多孔質架橋共重合体粒子であつて、該粒子中のフッ素含有量が1~30重量%の分離剤。



て、該粒子中のフッ素含有量が1~30重量%の分離剤。

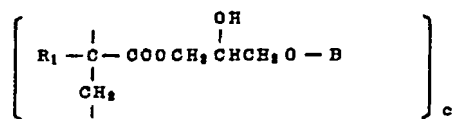
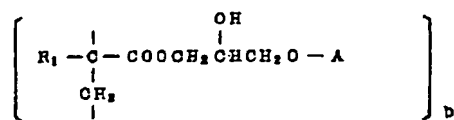
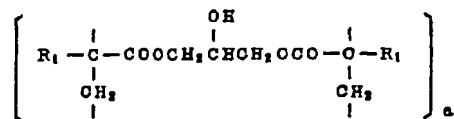


〔上記一般式(a)(b)(c)中、 R_1 は水素原子又はメチル基、 n は1~3の整数、 A は $-\text{COCF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{COCF}_3$ を表わす。

$a; b; c = 0.01 \sim 0.55; 0.01 \sim 0.70$

; 0.10 ~ 0.95 (モル分率))

(D) 下記一般式(a)(b)(c)の構成単位で実質的に構成されてなる多孔質重合体粒子であつて、該粒子中のフッ素含有量が1~30重量%の分離剤。



(上記一般式(a)(b)(c)中、R₁は水素原子又はメ

能であり、分離剤の適用範囲が広いという利点がある。尚、本発明分離剤からなるクロマトグラフィー担体の最大排除限界分子量は約200万である。

〔実施例〕

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

〔製造例-1〕

冷却管、温度計、撹拌機を取り付けた1Lの4ツロフラスコにイオン交換水450ml、塩化ナトリウム15g、2%ポリビニルアルコール水溶液150mlを加え撹拌した。さらに、この中へエチレングリコールジメタクリレート20g、グリシジルメタクリレート65g、ノオクタノール50g、シクロヘキサノール50g重合開始剤としてベンゾイルパーオキサイド1.0gの混合溶液を加えた。撹拌下70℃7時間反応を行ない、共重合体ポリマーを得た。ポリマーを水、メタノール、水の順で十分洗浄した。

乾燥後重合収率97.5%で白色多孔性球状樹

脂基、Aは $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 又は $-\text{COOCF}_3\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、Bは $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ を表わす。

a; b; c = 0.01 ~ 0.55; 0.01 ~ 0.70; 0.10 ~ 0.95 (モル分率))

本発明の分離剤による、蛋白質等の生体関連物質の分離は、工業的な分離プロセスとして採用されるが、勿論、分析手段としての採用も可能である。

上記いずれの場合も、具体的分離方法は、分離モードにより異なるものの、各分野で採用される方法に従つて実施できる。

例えば、ゲル透過クロマトグラフィーの場合は、分離剤を充てんしたカラムに、溶離液と同一の緩衝液を通液して平衡化させ、次いで、分離すべき成分を溶解したサンプルを負荷させたのち溶離液を一定流速で通液して溶出させる。本発明の分離剤は、膨張、収縮が極めて少ないため、溶離液として各種イオン強度およびpHの水溶液あるいは各種の有機溶剤等の使用が可

脂を得た。平均粒径は150μm、多孔度は0.97ml/g-Rであつた。

次いでN₂下300mlの4ツロフラスコ内に1,4-ジオキサン60ml及び前記のポリマー15.0gを入れ、50℃20分間撹拌した。この中へ2,2,2-トリフルオロエタノール5gと金属ナトリウム0.15gを加え、80℃で2時間反応を行なつた。さらに、溶液を50℃まで降温し、この中へグリセロール10g、濃硫酸0.5mlを添加し、50℃で1時間撹拌し、残存する銅銀官能基にグリセロールを付加し、フッ素ポリマーを得た。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

C : 52.8%

H : 4.4%

F : 7.5%

また、前記分離剤における、架橋成分(a)、フルオロアルキル基含有主鎖成分(b)、フルオロアルキル基を含まない親水性主鎖成分(c)の各モル分率は、0.15 : 0.24 : 0.58であつた。

〔圧力損失測定試験〕

内径10mmのガラスカラム(ジャケット付)に粒径を $74 \sim 205 \mu$ に整粒した製造例-1で得られた分離剤40mlを充填した。分離剤の層高は、50cmであつた。カラムを循環水で 25°C に保ち、カラム上部から、 $0.05M$ 、 $\text{pH } 7.0$ のリン酸緩衝溶液を一定流速で流した。充填層が安定し、カラムの上部にとりつけた圧力計の指針が一定になつたところで圧力計の目盛りを読みとり、その値から分離剤を充填していない、いわゆる空カラムの状態での前述した操作と全く同様の操作をした場合の圧力計の読みとり値を差し引いて圧力損失(Δp ・単位 $\text{kg/cm}^2/50\text{cm-bed}$)を求めた。

流速(LV :線流速、単位 m/Hr)を種々変えて圧力損失(Δp)を測定したところ第1図(1)に示した結果となつた。測定した流速範囲内では(LV として m/Hr 以下)、本発明分離剤(図中-1)を用いた場合の Δp と LV の間には直線関係が成立し、 $LV=7\text{m/Hr}$ という高流速で通液

しても、担体粒子の変形、破砕は全く認められなかつた。

なお、比較のために、製造例-1で得られた分離剤を用いる代わりに、架橋アガロースゲル(図中-2)を用いる以外は上記と全く同一の操作を行い、 Δp と LV の関係を求めた。その結果を第1図(2)に示した。

架橋アガロースゲルを用いた場合は、流速が $LV=1\text{m/Hr}$ をこえたあたりから、 Δp が急激に立ちはじめ、 $LV=2.5\text{m/Hr}$ 以上では、通液が困難となつた。

〔製造例-2〕

N_2 流通下、300mlの4ツ口フラスコ内に1,4-ジオキサン60ml及び実施例1と同様のポリマー15.0gを入れ、 50°C 20分間撹拌した。この中へ2,2,3,3,4,4,4-ヘプタフルオロ-1-ブタノール4.0gと金属ナトリウム0.15gを添加し、 50°C で2時間反応を行つた。その後 50°C まで降温し、5%硫酸水溶液50mlを加え、残存する側鎖官能基を加水分解

$C: 0.66$

〔製造例-4〕

N_2 気流下、300mlの4ツ口フラスコ内に1,4-ジオキサン60ml及び製造例-1と同様のポリマー14.8gを入れ、 50°C 、20分間撹拌した。この中へ、2,2,3,3,4,4,4-ヘプタフルオロブタノール4.0gと金属ナトリウム0.15gを加え、 50°C で2時間反応を行なつた。反応終了後ジオキサン溶液を除去後、伊紙上で、乾燥ジオキサンでポリマーを洗浄した。ポリマーを再度フラスコに戻しジオキサン50ml、グリセロール10gを入れ、10%硫酸のジオキサン溶液5mlをゆつくり滴下した。 50°C で4時間反応を行ない残存エポキシ基にグリセロールを導入し、フッ素ポリマーを得た。本分離剤の元素分析値は、次の通りであつた。

$C: 52.37\%$

$H: 6.70\%$

$F: 5.67\%$

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

し、フッ素ポリマーを得た。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

$O: 48.0\%$

$H: 5.2\%$

$F: 13.5\%$

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

$a: 0.18$

$b: 0.25$

$c: 0.57$

〔製造例-3〕

製造例-1において、親水性化合物としてグリセロールの代わりにグルコースを用いた以外は、製造例-1と全く同様の操作を行なつた。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

$C: 50.01\%$

$H: 6.67\%$

$F: 3.41\%$

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

$a: 0.18$

$b: 0.16$

a : 0.18

b : 0.52

c : 0.48

〔製造例-5〕

N₂ 気流下、300 ml の4ツロフラスコ内に乾燥1,4-ジオキサン60 ml 及び製造例-1と同様のポリマー/4.9 g を入れ、50℃で20分撹拌した。この中へ、2,2,2-トリフルオロエタノール4.7 g と金属ナトリウム0.12 g を加え、80℃で2時間反応を行なった。反応終了後、ジオキサン溶液を除去し、伊紙上で乾燥、ジメチルスルホキシド (DMF) 溶液で洗浄した。ポリマーを再度フラスコに戻し DMF 70 ml、ペンタエリスリトール8.8 g を入れ、この中へ10% 硫酸のジオキサン溶液5 ml をゆつくり滴下した。50℃、4時間反応を行ない、残存エポキシ基にペンタエリスリトールを導入し、フッ素ポリマーを得た。本分離剤の元素分析値は、次の通りであつた。

C : 50.60%

〔製造例-7〕

製造例-5において、フルオロアルキル基含有化合物として、2,2,3,3,4,4,4-ヘプタフルオロブタノールを用い、親水性化合物として、β-シクロデkastリンを用いた以外は、製造例-5と全く同様の操作を行なった。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

C : 50.53%

H : 6.50%

F : 3.32%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.18

b : 0.22

c : 0.60

〔製造例-8〕

4ツロフラスコ内に1,4-ジオキサン60 ml 及び製造例-1と同様のポリマー/5.0 g を入れ、50℃で20分間撹拌した。この中へ、パーフルオロ酸2.1 g を溶解したジオキサン溶液7 ml を滴下した。80℃で2時間反応を行な

H : 6.27%

F : 7.84%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.18

b : 0.35

c : 0.47

〔製造例-6〕

製造例-1において、親水性化合物としてグリセロールの代わりに水を用いた以外は、製造例-1と全く同様の操作を行なった。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

元素分析値

C : 51.62%

H : 6.28%

F : 7.22%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.18

b : 0.25

c : 0.57

つた後、ジオキサン溶液を除去し、フラスコへポリマーを戻した。この中へ10% 硫酸水溶液50 ml を入れ、50℃、5時間撹拌した。反応終了後ポリマーを水で充分洗浄し、フッ素ポリマーを得た。得られたフッ素ポリマーの元素分析値は次の通りであつた。

元素分析値

C : 52.15%

H : 6.03%

F : 5.32%

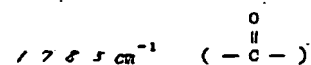
また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.18

b : 0.07

c : 0.75

又フルオロアルキル基含有基に由来する赤外吸収スペクトルは次の通りであつた。



〔製造例-9〕

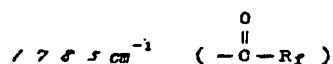
製造例-8において、親水性化合物として水の代わりにグリセロールを用いた以外は、製造例-8と全く同様の操作を行なった。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

C : 51.6%

H : 6.6%

F : 6.9%

又フルオロアルキル含有基に由来する赤外吸収スペクトルは、次の通りであつた。



また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.1%

b : 0.1%

c : 0.6%

〔製造例-10〕

300 mlの4ツ口フラスコに冷却管、温度計、

さらにこの中へ、グリセロール 6.234 g を溶解したジオキサン溶液 70 ml を加え、濃硫酸 0.70 ml を含むジオキサン溶液 5.0 ml を滴下し、50℃で5時間反応を行なった。反応後溶液を除去し、ポリマーを水で洗浄した。本分離剤の元素分析値は次の通りであつた。

元素分析値

C : 49.2%

H : 6.5%

F : 11.5%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.11

b : 0.4%

c : 0.40

〔製造例-11〕

製造例-10において、フルオロアルキル基含有化合物として2,2,2-トリフルオロエタノールの代わりに2,2,3,3,4,4,4-ヘプタフルオロブタノールを用いた以外は、製造例-10と全く同様の操作を行なった。本分離剤の元素分

析値は、次の通りであつた。

攪拌機、N₂導入管を取り付けた。この中へ塩化ナトリウム 6.81 g、イオン交換水 36 ml、2%ポリビニルアルコール 200 ml を加え、攪拌した。更にこの中へグリシジルメタアクリレート 64.01 g、トリエチレングリコールジメタアクリレート 16.03 g、トルエン 68.75 g、重合開始剤としてベンゾイルパーオキサイド 1.227 g の混合溶液を加えた。N₂雰囲気下、55℃、9時間重合を行ない、共重合体を得た。ポリマーを水、メタノールの順に3回繰り返し充分洗浄した。乾燥すると白色多孔性球状樹脂が得られ、重合収率は、92%であつた。又、多孔度は0.74 ml/gであつた。

次いで200 mlの4ツ口フラスコ内に上記ポリマー 12.852 g、1,4-ジオキサン（金属ナトリウムで乾燥後蒸留した溶媒を使用した。）、金属ナトリウム 290 mg、2,2,2-トリフルオロエタノール 4.373 g を加え、90℃、2.5時間反応を行なった。反応後ジオキサン溶液を除去し、ポリマーを乾燥ジオキサンで洗浄した。

析値は、次の通りであつた。

C : 50.6%

H : 6.9%

F : 8.3%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.11

b : 0.16

c : 0.73

〔製造例-12〕

300 mlの4ツ口フラスコに、冷却管、温度計、攪拌機、N₂導入管を取り付けた。この中へ塩化ナトリウム 4.60 g、イオン交換水 86 ml、2%ポリビニルアルコール水溶液 42 ml を加え攪拌した。更にこの中へグリシジルメタアクリレート 9.3 g、グリセロールジメタアクリレート 6.23 g、1-オクタノール 21.1 g、シクロヘキサノール 7.20 g、重合開始剤としてベンゾイルパーオキサイド 270 mg の混合溶液を加えた。N₂雰囲気下、55℃、9時間反応を行ない、共重合体を得た。ポリマーを水、メタ

ノール、の順に3回繰り返して充分洗浄した。

重合収率94.7%で白色多孔性球状樹脂を得た。

0.67

該共重合体の多孔度は 0.45 ml/g であつた。

次いで N_2 雰囲気下、200 mlの4ツロフラスコに前記乾燥ポリマー20.3 g、1,4-ジオキササン9.5 ml、2,2,2-トリフルオロエタノール3.0 / gを加え、50℃で20分撹拌した。この中へ水素化ナトリウム(50%含有)0.34 gを加え80℃で2.5 hr 反応を行なつた。反応に用いたジオキササン溶液を濾過し除去後、ポリマーを再度フラスコに戻し、10%硫酸水溶液100 mlを加え、50℃、6時間反応を行ない、冷却後、ポリマーを濾別し、水で洗浄し、フッ素分離剤を得た。元素分析値は次のとおりであつた。

元素分析値

C : 51.4 %

H : 6.9 %

F : 8.2 %

キササン5.2 ml、パーフルオロ酸3.16 gを加え、10時間加熱下撹拌を行なつた。反応終了後、ポリマーを水で充分洗浄し、フッ素分離剤を得た。このフッ素ポリマーの元素分析値は次のとおりであつた。

元素分析値

C : 52.3 %

H : 6.7 %

F : 6.4 %

フッ素化合物に由来する赤外吸収スペクトルは次のとおりであつた。

1785 cm^{-1} (カルボニル基)

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.22

b : 0.08

c : 0.70

(製造例-14)

300 mlの4ツロフラスコに冷却管、温度計、撹拌機、 N_2 導入管を取り付けた。この中へ塩化

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.17

b : 0.27

c : 0.56

(製造例-13)

300 mlの4ツロフラスコに冷却管、温度計、撹拌機、 N_2 導入管を取り付けた。この中へ塩化カルシウム・2水和物39.595 g、2%ポリビニルアルコール46.5 ml、イオン交換水86.5 mlを加え撹拌した。この中へ2-ヒドロキシメタクリレート13.99 g、エチレングリコールジメタクリレート6.06 g、シクロヘキサノール19.96 g、ノードデカノール7.83 g、ベンゾイルパーオキサイド2.57 gの混合溶液をフラスコの中へ加えた。 N_2 雰囲気下85℃、9時間反応を行ない共重合体を得た。ポリマーを水、メタノールの順に洗浄した。重合収率95.2%で白色多孔性樹脂を得た。該共重合体の多孔度は 0.53 ml/g であつた。

次いで上記乾燥ポリマー9.79 g、乾燥ジオ

ナトリウム13.232 g、イオン交換水86.5 ml、2%ポリビニルアルコール水溶液47 mlを加え、撹拌した。この中へグリシジルメタクリレート5.100 g、ポリエチレングリコールメタクリレート(日本油脂製PB-200、平均分子量261~303)6.077 g、エチレングリコールジメタクリレート6.076 g、メチルイソブチルケトン19.6 g、ベンゾイルパーオキサイド3.22 gの混合溶液を加えた。 N_2 雰囲気下、85℃、9時間反応を行ない共重合体を得た。ポリマーを水、メタノールの順に充分に洗浄した。重合収率93.6%で白色多孔性樹脂を得た。該重合体の多孔度は 0.97 ml/g であつた。

次いで上記ポリマー10.12 g、乾燥した1,4-ジオキササン5.5 ml、パーフルオロ酸2.79 gを加え、80℃で4時間反応を行なつた。反応終了後ポリマーを水で充分洗浄し、フッ素分離剤を得た。乾燥したポリマーは、少々撥水性が観察された。このフッ素ポリマーの元素分析値は次のとおりであつた。

元素分析値

C : 46.8%

H : 5.4%

F : 16.9%

フッ素化合物に由来する赤外吸収スペクトルは次のとおりであつた。

1785 cm^{-1} (カルボニル基)

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.3

b : 0.3

c : 0.4

〔製造例-15 (比較)〕

製造例-1において得られた白色多孔性樹脂/0.4gをフラスコ内に入れ、この中へ0.5%硫酸水溶液60mlを入れ、70℃、7時間攪拌し、エポキシ基を開環し、 α -ヒドロキシオール化合物を有する分離剤を得た。

元素分析値は以下の通りであつた。

元素分析値

C : 52.26%

H : 6.67%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.18

b : 0.82

〔製造例-16 (比較)〕

製造例-15において、親水性化合物として、水の代わりにグリセロールを用いた以外は、製造例-15と全く同様の操作を行なつた。

元素分析値は以下の通りであつた。

元素分析値

C : 52.06%

H : 6.78%

また各構成成分のモル分率は次の通りであつた。

a : 0.18

c : 0.82

〔蛋白質吸着試験 (パツチ法)〕

(1) 分離剤：製造例1、3、4、10、13、15で得られた共重合体粒子

(2) 蛋白質：牛血清 γ -グロブリン、牛血清アルブミン (Sigma 社製) を用いた。

(3) 吸着能測定法：

0.20重量%の各々 γ -グロブリンとアルブミンの0.10Mトリス・塩酸緩衝溶液 pH 7.50を調製した。この溶液中に特級硫酸アンモニウムを添加し、各種濃度の硫酸アンモニウム含有溶液100mlとした。一方、5.00mlの各分離剤を緩衝溶液で緩衝化し、これを遠心分離機で付着水を除き、上記の調製溶液に加えた。これらの溶液を12時間5℃で静置した後、振とう機で10℃6時間 (100 rpm, 4cmストローク) 振とうした。振とう終了後、溶液を濾過し、濾液の吸光度を280nmで測定し、検量線より、分離剤に吸着した蛋白質の重量を算出した。

(4) 結果：表1-8に示す。



表-1 フツ紫ポリマー(製造例-4)の γ -Globulin
吸着量(mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.50	5.00	7.50	10.00
製造例-4	1.6	0.3	2.2	3.1	4.7

表-2 ポリマー(製造例-15)の γ -Globulin
吸着量(mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.50	5.0	7.50	10.0	12.5
製造例-15	1.2	1.3	2.7	5.8	10.1	15.4

表-3 フツ紫ポリマー(製造例-1)の γ -Globulin
吸着量(mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
製造例-1	1.9	0.1	0.5	1.2	2.3	3.0

表-4 フツ紫ポリマー(製造例-3)の γ -Globulin
吸着量(mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	14.0
製造例-3	2.9	0.8	1.2	1.4	2.6	7.0

表-5 フツ紫ポリマー(製造例-1)の牛血清 Albumin
吸着量(mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.5	7.50	12.5	16.5	21.0	27.0	37.0
製造例-1	0.0	0.0	0.9	1.5	2.7	3.9	5.5	8.5

表-6 ポリマー(製造例-15)の牛血清 Albumin
吸着量(mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.5	7.50	12.5	17.5	25.0
製造例(比較)-15	0.0	0.0	0.9	2.24	4.56	9.98

表-7 フッ素ポリマー（製造例-13）の γ -Globulin 吸着量 (mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
製造例-13	1.7	0.8	1.6	3.1	4.9	6.7

表-8 フッ素ポリマー（製造例-10）の γ -Globulin 吸着量 (mg/ml-R)

(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度(%)	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
製造例-10	1.7	0.4	0.9	1.6	2.9	5.1

(蛋白質回収率の測定 (カラム法))

(測定条件)

分離剤：製造例-1で得られた共重合体粒子

樹脂粒径：88~105 μ mカラム：10mm ID \times 96cm^H (75.4ml Bed)溶媒液：1/10Mリン酸緩衝液 (pH 7.40)
+ 1/10M NaCl

流速：1.0 / ml/min

(実施例1)

製造例1及び14で得られた分離剤をふるいにかけて粒径が88~105 μ mのものを集め、内径10mmのガラスカラムに充填した。(75ml) 下記に示した分子量の異なる蛋白質を2%の濃度になる様に1/20Mリン酸バッファー (pH 7.40) 溶解し、あらかじめ150mM NaCl含有1/20Mリン酸バッファー (pH 7.40) で十分平衡化したカラムに50 μ l注入した。注入後、150mM NaCl含有1/20Mリン酸バッファーを1.0 / ml/minの流速で流し、蛋白質を溶離した。蛋白質の検出はUV計を用いて行なった。(280nm)

蛋白質の溶出位置から下式によりK_{av}を求め、この値を分子量に対してプロットし、校正曲線として第2図、第3図に示した。

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

蛋白質：下記表-9記載 (シグマ社製)

蛋白質負荷量：15%蛋白質溶液 2.0 ml (30.0mg)

検出方法：UV 280nm

上記実験条件下、蛋白質回収率を測定した。分離剤を充填したカラムに、各々蛋白質溶液を負荷し、上記溶媒液を用いて、流速1.0 / ml/minで溶離した。溶出した蛋白質をすべてメスフラスコに回収した。溶液の吸光度 (280nm) を測定し、あらかじめ測定しておいた蛋白質溶液吸光度検量線より、溶出した蛋白質重量を算出した。同様の操作を3回繰り返して平均回収率を求め、その結果を表-9に示した。

表-9 蛋白質回収率

蛋白質	回収率 (%)
人血清アルブミン	99
牛血清アルブミン	96
ヘモグロビン	93
卵白アルブミン	99
ミオグロビン	96
α -ラクトアルブミン	97
チログロブリン	90
牛血清 γ -グロブリン	91

ただし $\left\{ \begin{array}{l} V_t : \text{分離剤全体積 (ml)} \\ V_e : \text{溶出体積 (ml)} \\ V_o : \text{排除体積 (ml)} \end{array} \right.$

(尚、 V_o は分子量約200万のブルーデキストランを用いて求めた値)

第2図より本発明の分離剤を用いて得られた校正曲線は良好な直線性を示し、グルコ過クロマトグラフィー用担体として好適であることがわかる。

図中No	蛋白質	分子量 ($\times 10^3$)	等電点
1	チログロブリン	667	4.5
2	フェリチン	440	4~5
3	カタラーゼ	210	5.5
4	アルドラーゼ	158	5.1~5.3
5	アルコール脱水素酵素	140	8.5~10.0
6	トランスフェリン	80~90	5.3
7	人血清アルブミン	66.5	4.6~4.9
8	牛血清アルブミン	66.3	4.6~4.8
9	β -ラクトグロブリン	36.8	5.1
10	β -ラクトシダーゼ	29~30	5.3~5.9

11: キモトリブシンノーゲン A	25.7	9.5
12: ミオグロビン	17.8	8.1~8.3
13: α-ラクトアルブミン	14.4	4.1~4.8
14: リボスクレアーゼ A	13.7	9.5~9.7

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

ただし $\left\{ \begin{array}{l} V_t : \text{分離剤全体積 (ml)} \\ V_e : \text{溶出体積 (ml)} \\ V_o : \text{排除体積 (ml)} \end{array} \right.$

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の製造例1で得られた分離剤(1)及び比較例として架橋アガロースゲル(2)を用いて圧力損失と流速との関係を測定した結果を示すグラフである。図中、横軸は通液流速($m/hr.$)、縦軸は圧力損失($kg/cm^2-50cm bed$)を表わす。

第2図は、本発明の製造例1で得られた分離剤についての蛋白質校正曲線(実施例1)、第3図は製造例4(比較)で得られた分離剤についての同じく校正曲線(実施例1)である。第2図及び第3図において横軸は下式で表わされる K_{av} 値、縦軸は分子量を表わす。

(尚、 V_o は分子量約200万のブルーデキストランを用いて求めた値)

出願人 三菱化成工業株式会社
代理人 弁理士 長谷川 一
(ほか1名)

第1図

